

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

Anlage Nr.: E18

Bescheinigung

Die Herren Günther M a i e r h o f e r in 8000 München
und Gregor C e v c in 8011 Heimstetten haben eine
Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Herstellung von Liposomen"

am 24. August 1990 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die angeheftete Zusammenfassung, die der Anmeldung beizufügen, aber kein Bestandteil der Anmeldung ist, stimmt mit dem am 24. August 1990 eingereichten Original überein.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole C 07 F 9/10 und A 61 K 9/127 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 4. November 1991
Der Präsident des Deutschen Patentamts
Im Auftrag

Maget

München: P 40 26 833.0

BEST AVAILABLE COPY

PATENTANWÄLTE

DR. V. SCHMIED-KOWARZIK
1956 - 1985

DR. P. WEINHOLD

DR. P. BARZ

MÜNCHEN

DIPL.-ING. G. DANNENBERG

DR. D. GUDEL

DIPL.-ING. S. SCHUBERT

Belegexemplar
Darf nicht geändert werden

EUROPEAN PATENT ATTORNEYS

SIEGFRIEDSTRASSE 8

8000 MÜNCHEN 40

TELEFON: (0 89) 33 50 24

TELEGRAMME: WIRPATENTE

TELEX: 5 215 679 PAT D

FACSIMILE: (0 89) 39 23 33

Wd/Ri/Sz

Günther Maierhofer
Stöcklstr. 5a,
8000 München 60

und

Gregor Cevc
Gruberstr. 62
8011 Heimstetten

Verfahren zur Herstellung von Liposomen

Verfahren zur Herstellung von Liposomen

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung und zur Verwendung am Ort von Liposomen, das auch im industriellen Maßstab angewendet werden kann.

Liposomen sind kugelförmige Vesikel aus einer oder mehreren Lipid-Doppelschichten mit einem wässrigen Kern. Aufgrund dieses Aufbaus sind die Liposomen nicht nur als Modellsysteme für das Studium biologischer Membranen, sondern auch als Träger für eine Vielzahl wasserlöslicher, amphiphiler und lipophiler Substanzen interessant, da solche Stoffe sowohl in das Vesikelinnere eingebracht wie auch an oder in die Vesikelfwand eingelagert werden können. Dem entsprechend erhält die Anwendung von Liposomen auf vielen Gebieten wie Medizin, Molekularbiologie, Biotechnologie, Verfahrenstechnik und sogar Festkörpertechnologie eine zunehmende Bedeutung.

Für viele Anwendungen werden unter Umständen große Mengen an Liposomen benötigt, wobei zum Teil strenge Auflagen bezüglich Größe, Polydispersität, Ladung, biologischer und chemischer Verträglichkeit, Stabilität usw. gestellt werden. Außerdem sollten die Liposomenpräparationen nicht selten steril hergestellt und gehalten werden. Die meisten Herstellungsmethoden wurden jedoch für Laboratoriumszwecke entwickelt und sind vielfach nur schwer in einen großtechnischen Maßstab zu übertragen.

Zur Herstellung von Liposomen werden gegenwärtig drei verschiedene Grundverfahren angewendet.

Bei der sogenannten Detergenzmethode werden den die Membran ausbildenden Komponenten Detergenzien als Lösungsvermittler zugesetzt, wobei eine wasserlösliche Suspension von Mischmizellen entsteht. Die Detergenzien werden dann durch diverse Verfahren, z.B. Dialyse, pH- oder Temperatursprung entfernt, wodurch die Vesikelbildung eingeleitet wird. Eine besondere Ausführungsform dieser Detergenzmethode wird in der EP 56 781 beschrieben und für die Herstellung von Liposomen im industriellen Maßstab vorgeschlagen. Jedoch ist die Verwendung von Detergenzien und ihre anschließende Entfernung aus der Suspension der Mischmizellen sehr material- und zeitaufwendig.

Bei den Injektionsmethoden werden Lösungen der doppelschichtbildenden Membrankomponenten in einem organischen Lösungsmittel, z.B. in Äther oder

Äthanol, in eine wässrige Lösung eingespritzt. Diese Methode ist jedoch nicht zur Herstellung hochkonzentrierter Vesikelsuspensionen geeignet, und da sich das organische Lösungsmittel nur unvollständig entfernen läßt, verbleiben häufig biologisch bedenkliche Restanteile in der Präparation. Ein weiterer Nachteil liegt darin, daß die erhaltenen Liposomensuspensionen in der Regel sehr heterogen sind.

Bei den mechanischen Verfahren werden die Liposomen durch Schütteln, mehr oder minder heftigem Mischen, Aufprall und/oder Ultraschallbehandlung von doppelschichtbildenden Substanzen in heterogener wässriger Suspension erhalten. Diese Verfahren sind jedoch meist energieaufwendig und wenig schonend, sodaß sie leicht zu Überhitzung oder zu einem partiellen Abbau der membranbildenden Substanzen oder der einzuschließenden Wirkstoffe führen können. Die EP-A-102 324 als Beispiel eines solchen mechanischen Verfahrens beschreibt den Einsatz anionischer oder kationischer Tenside, um die von außen notwendige Energiezufuhr herabzusetzen, jedoch erfordert diese Methode die vorherige Bildung eines dünnen Films aus Membrankomponenten und Tensiden auf der Gefäßoberfläche, wodurch die Größe des Präparationsansatzes notwendigerweise beschränkt wird.

Die internationale Anmeldung WO 86/00238 beschreibt eine Technik zur Produktion von Liposomen mit homogener Größenverteilung durch Extrusion durch ein oder mehrere Filter. Die Methode eignet sich jedoch nur zur Auftrennung oder Fragmentierung von vorher gebildeten Liposomen. Sie erfordert die Anwendung hoher Drucke und führt z.B. zu Lipidverlust und damit einhergehender Filterverstopfung.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren bereitzustellen, mit dessen Hilfe es möglich ist, innerhalb kurzer Zeit und auf einfache und schonende Weise auch große Mengen homogener, konzentrierter und gegebenenfalls steriler Liposomensuspensionen herzustellen. Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch ein Verfahren gemäß Anspruch 1 gelöst.

Bei den die Doppelschicht des Liposoms ausbildenden Membrankomponenten handelt es sich ^{zweckmäßig} um amphiphile Lipoide bzw. Lipidsubstanzen der allgemeinen Grundstruktur X-Y, wobei X eine polare Kopfgruppe und Y einen apolaren Rest darstellt. Typischerweise sind die Membrankomponenten Lipide, vorzugsweise aus der Gruppe der Phospholipide, z.B. Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidsäure, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol; der Glykolipide, z.B. Ganglioside oder Globoside und deren Sphingolipide, z.B. Sphingomyeline und Cerebroside.

Es sind jedoch für denselben Zweck auch künstlich hergestellte, in biologischen Systemen nicht auftretende Lipide oder Gemische solcher Lipide mit natürlichen verwendbar. Besonders erwähnenswert sind die zweikettigen Derivate, die eine Phosphat- oder Sulfatgruppe tragen, Moleküle, die an ein Disaccharid oder Oligosaccharid gekoppelt sind, Substanzen, die mit einem Oligopeptid verknüpft sind oder ein bzw. mehrere Polymerreste tragen (wie z.B. Polyoxyethylene).

Zur Herabsetzung der für die Vesikularisierung notwendigen Energie werden diese Membrankomponenten zusammen mit einer oder mehreren randaktiven Substanzen eingesetzt, die denselben strukturellen Grundtyp X-Y, wie hinsichtlich der Membrankomponenten oben angegeben, aufweisen^{können}. Für spezielle Ausführungsformen der Erfindung kann es somit vorkommen, daß doppelschichtbildende Membrankomponente und randaktive Substanz identisch sind, oder aber daß Membrankomponenten durch Zusatz von nichtlipoiden Substanzen randaktiv werden. Die Kopfgruppe solcher randaktiven Moleküle kann anionisch, kationisch, zwitterionisch oder nichtionisch sein. Die Verbindungen können sowohl einzeln als auch im Gemisch eingesetzt werden.

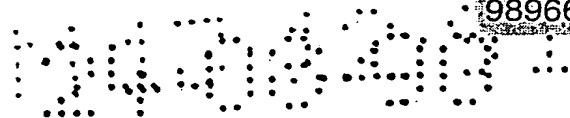
Beispiele für anionische Kopfgruppen sind Carboxylate, Sulfate, Sulfonate, usw.. Kationische Gruppen enthalten zumeist unterschiedliche Aminoderivate und Ableitungen von positiv geladenen Aminosäuren. Beispiele dafür sind z.B. Alkylammoniumbromid, Alkylmono- und dimethylsulfid, Lysin-derivate usw.. Der hydrophobe Teil besteht in der Regel aus Kohlenwasserstoffketten (z.B. Alkyl- oder Alkenoyl-, Acyl-, usw.), Steroiden oder ihren Substituenten, Cholan- oder Cholinderivaten, Cholanen (Glykocholat, Glykodesoxycholat, Taurocholat, Deoxycholat usw.), und viele andere mehr. Sie können geradkettig, verzweigt, aliphatisch substituiert, gesättigt oder teilgesättigt sein. Zwitterionische Kopfgruppen enthalten sowohl positiv als auch negativ geladene Gruppen. Beispiele dafür sind Aminoalkoholester der Phosphatidsäure, entsprechende Thioverbindungen, Betaine, Sulfobetaine, entsprechende Aminosäurederivate, usw.. Auch viele Lysophospholipide gehören zu dieser Gruppe. Die Kopfgruppen der nichtionischen Amphiphile enthalten hauptsächlich Hydroxylgruppen und gehören z.B. den Klassen der Polyoxyethylene oder der Saccharide an. Die nichtionischen Gruppen sind typischerweise direkt (wie z.B. im Falle von Alkylglukosiden oder Alkylthioglukosiden und Glukamiden), oder über eine Ringstruktur (wie z.B. im Falle von Digitonin, Triton, Tween, usw.) an den hydrophoben Teil gebunden.

Erfindungsgemäß lassen sich als randaktive Substanzen zweckmäßig folgende

Substanzklassen oder Abwandlungen davon einsetzen:

Alkylglukoside, Alkylthioglukoside, Alkylmaltoside, Alkyldimethylaminooxide, Betaine und ihre quarternären Derivate, Digitonine oder Gallensäuren, Glukamide, diverse Substituenten von Polyoxyethylenen, CHAP- oder Big CHAP-Detergenzien, Lysolipide oder Lysophospholipide sowie amphiphile Oligo- und Polypeptide. Vertreter dieser Substanzklassen sind z.B. Polyoxyalkyläther (im Handel erhältlich z.B. unter der Bezeichnung Brij 35, Brij 56), Octaäthylenglykolmonododecyläther, Nonaäthylenglykolmonododecyläther, Cetyltrimethylammoniumsalze, n-Octyl-N,N-Dimethylglycin, Dodecylmaltosid und -glukosid, Dodecyldimethylaminooxid, Polyoxyäthylenisotridecyläther, Polyoxyäthylenmonolauryläther, Decaoxyäthylenmonolauryläther, Laurylsulfat, Digitonin, Big-CHAP, CHAPS, CHAPSO, Gramicidin, Mellitin, Polyoxyäthylenlauryläther (m-Pigen PB), Polydocanol (Lubrol-PX), Octanoylmethylglukosid, Nonanoyl-N-Methylglukamid, Nonidet P-40, Alkylthioglukosid, Taurocholat-salze, Taurodeoxycholat-salze, Nonaäthylenglykol-Monododecyläther (Tessid), Nonaäthylenglykol-Octylphenoläther (Triton X-100), Heptaäthylenglykol-Octylphenyläther (Triton X-114), Lysolecithin, Lyso-Kephalin, Lyso-Phosphatidsäure, n-Octylsulfobetain und 3-Octyldimethylammoniumpropan-1-oleat (Zwittergent 3-16, 3-14, 3-12, 3-10, 3-0x), Polyoxyäthylensorbitan-mono-oleat, Polyoxyäthylensorbitanmonolaurat, Pluronic F-127, und viele mehr. Eine weitere Gruppe, die jedoch demselben Grundtypus zugeordnet werden kann, sind Oligo- oder Polypeptide mit asymmetrischer Verteilung hydrophiler und hydrophober Teile. Zu dieser Gruppe gehören z.B. etliche Toxine und Porenbildner, wie z.B. Gramicidin, Amphotericin usw.. Vorzugsweise werden randaktive Substanzen aus biologischen Quellen oder biologisch unbedenkliche Materialien eingesetzt; dazu gehören Gallensäuren und ihre Derivate, Gluko-, Malto- und Thioglukoside sowie Polyoxyäthylenderivate. Besonders bevorzugt sind Na-Cholat, Alkylglukoside, Polyoxyäthylenderivate, Sorbitol, Brij, Octyläthylenglykolmonododecyläther, Nonaäthylenglykolmonolauryläther, Na-Deoxycholat, Dodecylmaltosid, m-Pigen PB, die Genapol-Reihe, sowie die Tween-Reihe. Sehr gut geeignet sind auch Big-CHAP, CHAPS und CHAPSO, Deoxy-Big-CHAP, Bis-(2-Äthylhexyl)-Natriumsulfosuccinat, Genaminox KC, Genapol X-80, X-100 und X-150, Lubrol PX, Mega-8, -9 und -10, N-P 40, Pluronic F-127, Na-Taurocholat, Tessid und peroxidfreie Triton-Detergenzien.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren werden die Lipide bzw. Lipide als Membrankomponenten entweder als solche oder gelöst in einer geringen Menge eines geeigneten, mit Wasser mischbaren Lösungsmittels mit einer wässrigen



Lösung der randaktiven Substanzen kombiniert. Die wässrige Lösung kann außerdem Salze enthalten und z.B. eine physiologische Kochsalzlösung sein.

Gegebenenfalls können weitere übliche Zusatz- und Hilfsstoffe wie Membranstabilisatoren (z.B. Cholesterin, Tocopherol usw.), Konservierungsstoffe (z.B. Antioxydantien wie Ascorbinsäure oder Antibiotika), Farbstoffe, Riechstoffe, konsistenzändernde Mittel eingesetzt werden, die dem System zu jedem beliebigen Zeitpunkt entweder zusammen mit den Membrankomponenten und randaktiven Substanzen oder aber getrennt von ihnen zugeführt werden können. Im Bedarfsfall können der liposomalen Suspension auch Gelbildner, z.B. Carbopol, Hostacerin PN 73, Tylose, Rhodigel usw., zugesetzt werden.

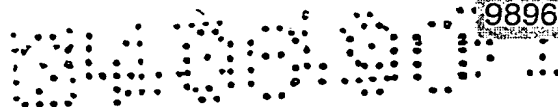
Die Vesikelbildung erfolgt, indem man die auf diese Weise erhaltene heterogene Mischung durch ein Filter passieren läßt. Das molare Verhältnis L/D von lipoiden bzw. lipiden Membrankomponenten (L) zu randaktiven Substanzen (D) liegt hierbei zweckmäßig zwischen 1 und 20, bevorzugt zwischen 2 und 6, besonders bevorzugt zwischen 3,1 und 5,5. Bei zu niedrigen L/D-Werten werden Mischmizellen erhalten, bei L/D-Werten von größer als 20 steigt der zur Filtration nötige Druck stark an, und die so hergestellten Liposomen neigen zu Fusion und Aggregation. Man arbeitet vorzugsweise bei einem geringen Überdruck von 1 bis 6 bar. Der Porendurchmesser der Filter liegt zweckmäßig zwischen 0,1 und 0,8 μm , vorzugsweise zwischen 0,15 und 0,3 μm . Soll die Liposomenpräparation steril erhalten werden, so beträgt die obere Grenze des Porendurchmessers 0,22 μm .

Das Filtermaterial spielt hierbei kaum eine Rolle. So können z.B. Membranen aus Zelluloseacetat oder Zellulosenitrat, aus reiner Zellulose, aus Nylon, aus Polycarbonat, oder Membranen auf anorganischer Basis eingesetzt werden. Die Herstellungstemperatur wird der Nutz- und Trägerstoffwahl angepaßt und liegt ^{zweckmäßig} zwischen 0 und 95 °C. Vorzugsweise arbeitet man in einem Temperaturbereich von 18 - 70 °C; besonders bevorzugt für die Lipide mit fluiden Ketten ist der Temperaturbereich zwischen 18 und 38 °C, für die Lipide mit geordneten Ketten zwischen 45 und 60 °C.

Der pH-Wert liegt zweckmäßig in einem Bereich von 1 - 10. Vorzugsweise wird im pH-Bereich zwischen 5,5 und 8, besonders häufig zwischen 6,5 und 7,5 gearbeitet.

Die zu verkapselnden Wirkstoffe können dem System sofort zugefügt werden, sodaß ihr Einschluß spontan bei der Bildung der Liposomen erfolgt. Die

Verkapselung der Wirkstoffe kann jedoch auch erst nach Herstellung der Liposomen erfolgen, indem man die fertige Liposomenpräparation unter mechanischer Agitation in ein den jeweiligen Wirkstoff oder die Wirkstoffkombination enthaltendes Lösungsmittel, vorzugsweise Wasser, oder in einen flüssigen Wirkstoff selbst bringt. Die einzukapselnden Wirkstoffe unterliegen keiner Beschränkung. Es können sowohl völlig wasserlösliche als auch ganz unpolare fettlösliche Moleküle in die Lipidvesikel eingeschlossen werden. Vorzugsweise werden jedoch mehr oder weniger amphiphile Wirkstoffe in oder an die Vesikel gebracht, weil solche die beste Stabilität gepaart mit einer optimalen Wirkung gewährleisten. Die Wirkstoffe können beispielsweise aus dem Bereich der Arzneimittel, der Diagnostika, der Kosmetika, oder aus biologisch aktiven Substanzen ausgewählt sein. Die Einschlußausbeute hängt sowohl von den Vesikelamphiphilen als auch von den Wirkstoffen und sonstigen Systemkomponenten ab und kann im Falle wasserlöslicher Substanzen über 80% und im Falle von fettlöslichen Substanzen bis zu 100% betragen. Wenn wasserunlösliche Substanzen nicht direkt in die Lipiddoppelschicht der Liposomen eingebaut werden, kann das Lipid- zu Nutzstoffverhältnis den Wert von 1 unterschreiten. Vorzugsweise arbeitet man mit weniger als 50% der Nutzsubstanz, besonders bevorzugt sind die Anteile unter 10% bezogen auf die Grundlipidsubstanz. Im Falle von wasserlöslichen Substanzen kann der "Wirkstoff"-Anteil bis zu 40% betragen; vorzugsweise arbeitet man mit weniger als 15%, besonders bevorzugt ist der Anteil von einigen wenigen Prozent bezogen auf das Gesamtvolumen. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht auch die sofortige Herstellung der liposomalen Suspension (z.B. eines liposomalen Arzneimittels) direkt am Ort der Anwendung (z.B. Klinik, Arztpraxis, Apotheke usw.) bzw. Verwendung. Somit löst es etwaige Lagerungs- und/oder Stabilitätsprobleme der liposomalen Suspension bzw. des Arzneimittels. Hierbei werden die doppel-schichtbildenden amphiphilen Lipide bzw. Lipide, die randaktive Substanz sowie der zu verkapselnde Wirkstoff einzeln, als Zwei- oder Dreikomponentengemisch in Form der Trockensubstanzen in geeigneten Gefäßen gelagert. Die heterogene Mischung wird erst kurz vor der Applikation gebildet und durch ein Filter gepreßt. Stabilitäts- und Lagerungsprobleme der liposomalen Suspension werden dadurch auf sehr einfache Weise gelöst. Es wurde überraschenderweise gefunden, daß das erfindungsgemäße Verfahren die Herstellung von Liposomen ermöglicht, die transkutane Wirkung zeigen, z.B. Liposomen mit Analgetika, Antiphlogistika usw.. Die Wirkungsdauer



eines liposomal verkapselten Wirkstoffs ist nicht nur gegenüber dem freien Wirkstoff verlängert, sondern auch im Vergleich mit Liposomenpräparationen, die nach bekannten Verfahren, z.B. Ultraschallbehandlung, erzeugt wurden. Die erfindungsgemäß erzeugten Liposomen erlauben also nicht nur eine sehr hohe Penetration des Wirkstoffs durch die Haut und Schleimhäute, sondern sie stellen gleichzeitig auch ein verbessertes System zur kontrollierten Wirkstoff-Freisetzung dar. Für diese Wirkung spielt sowohl die bei der Bildung der Liposomen eingesetzte randaktive Substanz als auch die Art, Form, oder die Zusammensetzung der Liposomen eine entscheidende Rolle.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist unabhängig von der Größe der zu verarbeitenden Ansätze anwendbar. Es können sowohl Ansätze im Labormaßstab, d.h. kleiner als 2 ml, als auch Ansätze im großtechnischen Maßstab, also von größer als 100 Liter, bequem verarbeitet werden. Es ist auf diese Weise möglich, sowohl hochkonzentrierte als auch sehr homogene Liposomen-suspensionen zu erhalten, wobei die Größe der Liposomen gleichermaßen durch die absoluten und relativen Konzentrationen und Eigenschaften der Systembestandteile, z.B. durch das molare Verhältnis L/D von Membrankomponenten und randaktiven Substanzen oder durch die Natur der verkapselten Wirkstoffe, wie auch von den Umgebungsparametern, z.B. dem Porendurchmesser, Überdruck, bzw. Fließgeschwindigkeit usw. beeinflußt wird.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die vorliegende Erfindung ohne sie zu begrenzen.

Beispiele 1 - 9

1,5 g Sojalecithin (98 %iges Phosphatidylcholin, PC) wurden in 1,5 ml Äthanol abs. gelöst; verschiedene Mengen an Natriumcholat wurden in 27 ml 0,9 % Kochsalzlösung gelöst. Beide Lösungen wurden vereint, die Mischung anschließend bei geringem Überdruck (1-6 bar) durch ein Sterilfilter mit 0,22 µm Porengröße passieren gelassen. Die Tabelle zeigt den mittleren Durchmesser der erhaltenen Liposomen in Abhängigkeit vom molaren Verhältnis L/D von Lipid zu Cholat.

Tabelle

Beispiel	L/D	Cholat total (mg)	Lipidkonz. mg/ml	Cholatkonz. mg/ml	Größe nm Ø
1	2.0	400	50	13.3	198
2	2.52	320	50	10.6	115.3
3	2.69	300	50	10.0	113.7
4	2.88	280	50	9.3	113.7
5	3.12	260	50	8.6	113.4
6	3.36	240	50	8.0	134.9
7	3.66	220	50	7.3	142.7
8	4.03	200	50	6.6	205.4
9	8.1	100	50	3.3	224.0

Präparationsvolumen 30 ml; PC total 1500 mg, Filter 0.22 µm

Beispiele 10 und 11

Es wurde in gleicher Weise wie oben verfahren, jedoch wurde als randaktive Substanz Natriumdeoxychololat eingesetzt. Die Lipidkonzentrationen betrugen 40 mg/ml (L/D = 9.7) oder 88 mg/ml (L/D = 4.0). Es wurden Liposomen der Größe 750 nm bzw. 166.8 nm erhalten.

Beispiel 12

Es wurde wie oben verfahren, wobei 500 mg PC und als randaktive Substanz 71 mg Gramacidin (L/D = 10.0) eingesetzt wurden.

Beispiel 13

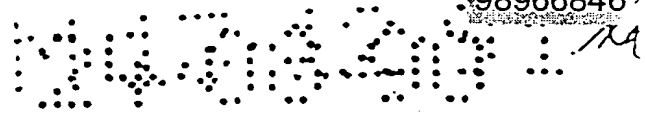
Es wurde wie oben verfahren, wobei 1500 mg PC und als randaktive Substanz 100 mg Stearylamin (L/D = 5.0) eingesetzt wurden.

Beispiel 14

Es wurde wie oben verfahren, wobei 1500 mg PC und als randaktive Substanz 100 mg Hexadecyltrimethylammoniumbromid (L/D = 6,84) eingesetzt wurden.

Beispiele 15 - 17

Es wurde wie oben verfahren, wobei die Lipidkonzentrationen 50, 100 und 150 mg/ml betrugen und als randaktive Substanz Brij.56 (Polyoxyäthylen-



äther; 10 Cetyläther) in einer Konzentration eingesetzt wurde, daß das Verhältnis L/D 4.0, 5.0, 6.0, 7.3, 8.5 oder 21.25 betrug.

Beispiel 18

In sterile Fläschchen mit Septum werden im Reinraum abgefüllt:

Fläschchen 1: 50 mg Amphotericin B + 41 mg Na-Deoxycholat (entspricht der sich im Handel befindlichen Zusammensetzung)

Fläschchen 2: 1000 mg PC, 100 mg Na-Cholat

Fläschchen 3: 1 ml Äthanol abs.

Fläschchen 4: 10 ml polares wässriges Lösungsmittel, z.B. 0.9% Kochsalzlösung, PBS (10 mM Phosphatpuffer, 0,9% NaCl) oder Wasser, steril

Mit einer Spritze werden die 10 ml wässriges Lösungsmittel aus Fläschchen 4 entnommen, in Fläschchen 1 überführt und der Wirkstoff gelöst. In gleicher Weise wird der Äthanol aus Fläschchen 3 in Fläschchen 2 überführt und das Lipid mit dem Na-Cholat gelöst. Sind die Trockensubstanzen in den jeweiligen Lösungsmitteln gelöst (Dauer ca. 5 Minuten), wird die Wirkstofflösung in eine Spritze aufgezogen, anschließend in die gleiche Spritze das gelöste Lipid und durch leichtes Schütteln von Hand oder vorsichtiges Hin- und Herbewegen des Spritzenkolbens die heterogene Grundmischung gebildet. Auf die Spritze werden anschließend ein steriler Filtrationsvorsatz, z.B. Minisart 0.22 µm Porendurchmesser, und eine Kanüle aufgesetzt. Mit leichtem Druck wird die Grundmischung direkt über ein Septum in die entsprechende Infusionslösung, z.B. 5% Fructose-Lösung, zur anschließenden intravenösen Applikation filtriert.

Die hier verwendete Wirksubstanz Amphotericin B ist im pH-Bereich 6-7 wasserunlöslich, kann aber mit Hilfe von randaktiven Substanzen gelöst werden.

Sollen Wirksubstanzen, die schwer oder nicht wasserlöslich sind, sich nicht oder nicht in ausreichender Menge in Äthanol bzw. einer äthanolischen Lipidlösung lösen und sich auch nicht in ausreichender Menge mit Lösungsvermittlern und/oder randaktiven Substanzen in vorstehend geschilderter Weise lösen lassen, in gleicher Weise liposomal verkapselt werden, nimmt man solche Wirksubstanzen zunächst mit anderen organischen Lösungsmitteln, z.B. Methanol, Chloroform oder Gemische davon, auf, mit oder ohne randaktive Substanz, und überführt sie an einem Vakuumrotationsverdampfer zur Trockne. Dieses Verfahren kann auch kontinuierlich sein. Durch Nach-

trocknung unter Vakuum werden letzte Spuren an organischem Lösungsmittel quantitativ entfernt, die Trockensubstanz dann portionsweise abgefüllt.

Beispiel 19

Das nachfolgende Beispiel ist stellvertretend für alle wasserlöslichen Wirkstoffe, die durch Filter mit Porengröße 0,1 - 0,8 μm , vorzugsweise 0,15 - 0,3 μm , filtrierbar sind. Es werden abgefüllt in:

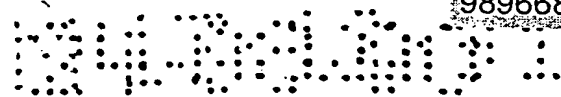
Fläschchen 1: 600 mg Natriumascorbat

Fläschchen 2: 1000 mg PC + 150 mg Na-Cholat

Fläschchen 3: 1 ml Äthanol abs.

Fläschchen 4: 19 ml 0.9% Kochsalzlösung

Zum Lösen der Trockensubstanzen werden mit einer Spritze Inhalt von Fläschchen 4 in Fläschchen 1 überführt, Inhalt von Fläschchen 3 in Fläschchen 2. Anschließend werden beide Lösungen mit einer Spritze aufgenommen, in der Spritze gemischt und mit leichtem Überdruck durch einen Filtrationsvorsatz, z.B. Minisart 0.22 μm , filtriert.



Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Liposomen, dadurch gekennzeichnet, daß man doppelschichtbildende amphiphile Lipide bzw. Lipoide als Membrankomponenten entweder gelöst, in einem mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel, oder als solche mit einer wässrigen Lösung von mindestens einer randaktiven Substanz, die gegebenenfalls auch den zu verkapselnden Wirkstoff enthalten kann, kombiniert, und die so erhaltene heterogene Mischung anschließend durch ein Filter passieren läßt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membrankomponenten ausgewählt sind aus biologischen Lipiden, Phospholipiden, Glykolipiden, Sphingolipiden, oder Sterolen.
3. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Membrankomponenten ausgewählt sind aus Phosphatidylcholin, Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidsäure, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol, Cardiolipin, Sphingomyelin, Gangliosiden, Globosiden und Cholesterin und seinen Derivaten.
4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die randaktiven Substanzen ausgewählt sind aus Gallensäuren und ihren Derivaten, Glukosiden, Maltosiden, Thioglukosiden, Polyoxyäthylenderivaten, porenbildenden Antibiotika oder Lysophospholipiden.
5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die randaktiven Substanzen ausgewählt sind aus Na-Cholat, Na-Deoxycholat, Na-Taurocholat, Na-Glykocholat, Mega 10, Mega 9, Mega 8, Octyl- β -thioglukopyranosid, Heptyl- β -thioglukopyranosid, Decyl-, Nonyl-, Octyl-, Heptyl-, Hexyl-Glukopyranosid, Dodecyl- oder Decyl- β -Maltosid, Genapol X 080, X 100, X 150, $C_{12}E_8$, $C_{12}E_9$, Tessid, Lubrol PX, Genapol C 100, Brij 35, Brij 56, Brij 76, Trikolal 8, Lysophosphatidylcholin, Lysophosphatidsäure, Lysophosphatidyläthanolamin, Lysophosphatidylglycerin.
6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das molare Verhältnis L/D von Membrankomponenten (L) zu randaktiven Substanzen (D) 2 bis 20, vorzugsweise 2 bis 6, besonders bevorzugt 3,1 bis 5,5 beträgt.



7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das polare Lösungsmittel Wasser, eine wässrige oder nichtwässrige, jedoch assoziierende Lösung ist.
8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Filtration bei einem geringen Überdruck, insbesondere 1 bis 6 bar erfolgt.
9. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Porengröße des Filters 0,1 - 0,8 μm , insbesondere von 0,15 - 0,3 μm und ganz besonders bevorzugt 0,18 - 0,22 μm ist.
10. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der üblichen Hilfs- oder Zusatzstoffe, vorzugsweise Gelbildner, Membranstabilisatoren oder Konservierungsmittel verwendet wird.
11. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß bei Abwesenheit des Wirkstoffs in der Lösung oder Suspension die Einkapselung des Wirkstoffs in die Liposomen nach deren Bildung erfolgt.
12. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Liposomen erst kurz vor der Applikation, insbesondere am Ort der Anwendung, hergestellt werden.
13. Verwendung der nach einem der Ansprüche 1 bis 12 hergestellten Liposomen, insbesondere zur Verstärkung, Beschleunigung oder sonstigen Optimierung des Transports von Liposomen und/oder Wirkstoffen durch die Haut, Schleimhaut oder andere Barrieren epithelialen Ursprungs.



ZUSAMMENFASSUNG

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Liposomen, bei dem man doppelschichtbildende amphiphile Lipide bzw. Lipotide als Membrankomponenten entweder gelöst in einem mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel, oder als solche mit einer wäßrigen Lösung einer randaktiven Substanz, die gegebenenfalls auch den zu verkapselnden Wirkstoff enthalten kann, kombiniert, und die so erhaltene heterogene Mischung anschließend durch eine Filter passieren läßt.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.